云 南 植 物 研 究 2010, **32** (5): 393～400
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724/SP.J.1143.2010.10070

姜科砂仁属植物 DNA 条形码序列的筛选*

杨振艳[1,2], 张 玲[1**]
(1 中国科学院西双版纳热带植物园, 云南 勐腊 666303; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 砂仁属 (*Amomum*) 隶属于姜科, 全属约 150 种, 我国有 39 种。该属多种植物可作药物或香料, 但目前砂仁属的分类还不清楚, 准确鉴定物种有很大难度。本研究利用 DNA barcoding 技术, 对砂仁属 50 种 121 个个体的 *matK*、*rbcL-a*、*trnH-psbA* 序列及其不同组合进行比较, 用 Taxon DNA 计算种间、种内 barcoding gap, 运用相似法的 BLASTn 计算条码的正确鉴定率, 筛选适合砂仁属的条码片段。结果显示: 所有条码的 barcoding gap 均不存在; *matK* 的正确鉴定率高于 *trnH-psbA* 和 *rbcL-a*, 联合片段的条码正确鉴定率高于单片段条码, 三个片段联合条码的正确鉴定率最高。因此, 推荐 *matK* + r*bcL-a* + *trnH-psbA* 作为砂仁属物种鉴定的候选条码。

关键词: 砂仁属; DNA 条形码; *matK*; *rbcL-a*; *trnH-psbA*; *matK* + *trnH-psbA* + *rbcL-a*
中图分类号: Q 78, Q 949 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2700(2010)05-393-08

Screening Potential DNA Barcode Regions in *Amomum* (Zingiberaceae)

YANG Zhen-Yan[1,2], ZHANG Ling[1**]
(1 *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Science*, Mengla 666303, China;
2 *Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: *Amomum* contains 150 species, and 39 of them are found in China. Many *Amomum* species are used in traditional Chinese medicines and favorite food condiment. The intrageneric classification of this genus is largely unclear, and the accurate identification of species is difficult. DNA barcoding is a technique to identify species using standardized DNA region. The COI sequence has been successfully used to identify animal species. Unfortunately, there are no universally accepted barcode systems for plants. This study compared the each three candidate plastid regions (*matK*, *rbcL-a*, *trnH-psbA*) and the combined data (*matK* + *rbcL-a*, *matK*+*trnH-psbA*, *rbcL-a* + *trnH-psbA*, *matK* + *rbcL-a* + *trnH-psbA*) among 121 accessions representing 50 species of the genus. In order to screen out the suitable barcode for identifying the species of *Amomum*, Taxon DNA was used to estimate the barcoding gap between interspecific and intraspecific distances, and BLASTn was used to calculate the rate of correct identification. The results indicated that there was no DNA barcode gap in three loci. The correct identification of *matK* was higher than that of *trnH-psbA* or *rbcL-a*, the combined data has higher correct identification than that of single one, and the three-locus combined data showed the greatest level of species discrimination. To sum up, *matK* + *rbcL-a* + *trnH-psbA* can be considered as a potential barcode for identifying the species of *Amomum*.

Key words: *Amomum*; DNA barcoding; *matK*; *rbcL-a*; *trnH-psbA*; *matK* + *trnH-psbA* + *rbcL-a*

* 基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-YW-N-0807)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: zhangl@xtbg.org.cn
收稿日期: 2010-04-01, 2010-07-20 接受发表
作者简介: 杨振艳, 女, 中国科学院西双版纳热带植物园在读研究生。E-mail: yzy832yzy@126.com

砂仁属（*Amomum* L.）是姜科（Zingiberaceae）的第二大属，约150余种，主要分布于亚洲、大洋洲的热带地区，我国有39种（Wu and Larsen，2000）。本属植物多为常绿草本，多生长在潮湿森林的林窗和林际处，也有少数较小的附生种（Sakai and Nagamasu，1998）。本属中很多种可供药用或作香料，能祛风止痛，健胃消食（Tsai等，1981）。

砂仁属植物的分类比较混乱，直到20世纪初，Kress等（2002）综合运用形态学和分子学的手段建立了姜科新的分类系统，把砂仁属归在山姜亚科的山姜族中，才确立了砂仁属的分类位置；Xia等（2004）选用*ITS*和*matK*两个片段阐述了砂仁属的系统发育关系，并提出了新的可用于砂仁属分类的形态特征（如果实类型）。由于砂仁属种类繁多，形态结构的差异复杂，花部变异尤为多样，物种鉴定困难，所以迫切需要一种快速准确的鉴定砂仁属物种的方法。

DNA条形码（DNA barcoding）是利用一个或少数几个短的DNA片段（400～800 bp）对地球上现有的物种进行快速、准确的识别和鉴定的一项新技术（Tautz等，2002，2003；Hebert等，2003a，b）。大量研究结果证明了线粒体基因COI片段对动物物种的识别和鉴定切实可行（Hebert等，2004；Hajibabaei等，2006；Yoo等，2006；Yancy等，2008），但由于线粒体基因在植物中进化要比动物慢的多，不适合做植物的条形码（Kress等，2005），所以大家把目光转向叶绿体和核基因。由于核基因组通常具有多拷贝的特性，且物种内变异较大，引物通用性差，并且扩增时对模板DNA的质量要求高，不适用于存在DNA降解的材料（Kress等，2005），因此，植物中最可能的条形码还是从叶绿体基因组中选择（Chase等，2005；Cowan等，2006）。

植物条形码片段的筛选已经做了大量的工作（Chase等，2007；Kress and Erickson，2007；Pennisi，2007；Erickson等，2008；Lahaye等，2008；Liu等，2010），但通用于植物的条形码片段仍存在很多争论，目前比较一致的观点是，适用于植物界的条形码将会是两个或多个片段的组合（Kress and Erickson，2007；Fazekas等，2008；Hollingsworth等，2009），如较保守的编码基因*rbcL-a*、进化较快的*matK*的部分片段和非编码基因*trnH-psbA*（Kress等，2009）。

本研究通过对砂仁属50个种121个个体的*matK*、*rbcL-a*和*trnH-psbA*及不同片段组合的比较，尝试筛选一条适用于该属植物的DNA Barcoding鉴定片段或片段组合。另外，本研究选用短期分化物种较多的姜科材料，并在种的水平上检验"生命条码联盟"（CBOL）提出的核心片段，这对植物条码片段的筛选有一定的推进作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验以Kress等（2002）的新的姜科分类系统和Xia等（2004）砂仁属系统研究为基础，共采集123个实验材料，其中红豆蔻（*Alpinia galanga*（L.）Willd）2个个体为外类群，砂仁属材料50个种121个个体为内类群。另从GeneBank上获得13条序列（11条*matK*序列，2条*rbcL-a*序列）。

实验材料大部分是经硅胶快速干燥的叶片，少部分是DNA原液，主要有三个来源，多数来自夏永梅女士野外采集的材料，一部分采自中国科学院西双版纳热带植物园姜园的栽培植株，还有小部分为美国Smithsonian Institution的W. John Kress博士提供，凭证标本分别存放于中国科学院西双版纳热带植物园标本馆（HITBC）和美国国家标本馆（NMNH）。

1.2 实验方法

总DNA提取采用改良的CTAB法（Doyle and Doyle，1987）。PCR扩增反应在PERKIN ELMER（PE）9600或9700型PCR仪上进行。*matK*、*trnH-psbA*和*rbcL-a*三个DNA片段扩增反应程序均采用：97℃预变性4 min，94℃变性1 min，52℃退火1 min，72℃延伸1 min。32个循环后，72℃延伸10 min，根据具体情况而略有变动。扩增反应采用25 μl的反应体系，包括2.5 mmol·L^{-1}的10×buffer已加入镁离子，0.2 U的Taq聚合酶，250 μM的dNTPs，正反向引物浓度各为0.2 μmol·L^{-1}，以及约80 ng的模板DNA。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后，用上海生工生物工程技术服务有限公司的纯化试剂盒纯化以备测序反应之用。

扩增引物同时作为测序引物，利用正反向引物分别对两条链测序（*trnH-psbA*采用双向测序，*matK*和*rbcL-a*采用单向测序），反应依据双脱氧链终止法（Sang等，1997）。测序反应在PE9600或9700型PCR仪上进行，采用5 μl的反应体系，包括：1 μl的测序mix（PE公司的Bigdyev3.1测序试剂盒），0.5 μl的测序引物，

1 μl 的 PCR 纯化产物和 2.5 μl 的重蒸水。反应程序为：95℃预变性 4 min；96℃变性 10 s、50℃退火 5 s、60℃延伸 4 min，共 33 个循环。反应产物经 95％乙醇＋乙酸钠沉淀 30 min，之后用 70％乙醇 150 ml 洗涤，干燥后加入 15 μl 的变性剂充分溶解，经 95℃变性 4 min 后上样，在 ABI3700 型自动测序仪上进行检测。

序列编辑和拼接应用 Lasergene v7.1 软件中的 SeqMan（DNASTAR Inc.，Madison，Wisconsin，USA；Burland，2000）完成。3 个叶绿体 DNA 序列数据进行单独及联合序列矩阵构建，在 EditPlus 中将不同 DNA 序列矩阵结合形成联合矩阵，矩阵中去除只有一个样本的种，且在构建联合矩阵时，如果某个体只有一条（当两个 DNA 序列矩阵结合时）序列或两个（当三个 DNA 序列矩阵结合时）序列，此个体也被去除，因为序列矩阵的大小对正确鉴定率的影响是次要的（Hollingsworth 等，2009）。利用 Clustal X2（Larkin 等，2007）对矩阵进行自动排序，并利用 Bioedit（Hall，1999）与测序峰图进行人工校对。对单片段及片段组合进行分析，采用邻接法（neighbor-joining，NJ）构建基因树。邻接法分析在 PAUP* 4.0b10（Swofford，2002）中运行；邻接法采用自展分析（Bootstrap analysis），1000 次抽样，根据抽样自展值（Bootstrap value，BS）评估分支的可靠性。

Barcoding gap 是检验 DNA 条形码的一个指标，即理想的条形码检测到的同属内种间遗传变异应显著大于种内遗传变异，并形成一个明显间隔区（Meyer and Paulay，2005；Lahaye 等，2008）。该检验采用 Meier 等（2006）开发的 TaxonDNA 软件结合一般的统计软件完成，用柱形图呈现种间、种内的遗传距离的分布频度（宁淑萍等，2008），然后采用中位数和 Wilcoxon 双样本检验（http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics.html）进行不同条码种间、种内距离的差异显著性检验（Liu 等，2010）。

采用 BLASTn（Altschul 等，1997）计算种水平上的正确鉴定率（Correct Identification，CI），将每个片段及片段组合的序列矩阵，经 BLASTn 格式化成为一个数据库，这样每个序列矩阵就成为了一个 Query 和一个 Database，每个 Query 分别在对应的 Database 进行搜索比对。在某条序列的比对结果中，如果除了这条序列，这个种的其它个体得到了最高分就认为这个种在种水平上鉴定正确（Kress 等，2009）；如果没有得到最高分数或是与其它的种混在一起，就认为这条序列在种水平上鉴定错误。

同时，正确鉴定率的计算还参考了 Hollingsworth 等（2009）的“同种个体分组聚类”标准，即是将 NJ 树上同种的个体聚成一枝认为就是正确鉴定到种，相反，如果种间个体的序列没有差异，或是 NJ 树上某种的一个个体没有和这个种的其他个体聚成一枝，就认为是鉴定错误。

2　结果

本研究获得砂仁属及其外类群的三个叶绿体片段（*matK*、*rbcL-a* 和 *trnH-psbA*）的序列，对这些序列的单独矩阵和不同联合矩阵的相关数据进行分析，结果如下：

2.1　不同片段的 PCR 和 SEQ（sequencing）的成功率

三个片段在种水平（50 个）和个体水平（121 个）上的 PCR 及 SEQ 的成功率都偏低，且均为 *rbcL-a* 的最高，*trnH-psbA* 的次之，*matK* 的最低（表 1）。*rbcL-a* 和 *matK* 两片段采用单向引物测序，有＞90％的序列一次性测序成功，*trnH-psbA* 因为需要正反向引物两端测序，约 80％序列一次性测序成功。不同片段的 PCR 和 SEQ 的成功率主要受到所选片段引物通用性影响，

表1　不同片段及其不同组合的 PCR 和 SEQ（sequencing）结果比较

Table 1　Comparison of PCR and sequencing (SEQ) results from different loci and combined data sets

	trnH-psbA		*rbcL-a*		*MatK*		*trnH-psbA* ＋ *rbcL-a*		*matK* ＋ *rbcL-a*		*trnH-psbA* ＋ *matK*		*matK* ＋ *rbcL-a* ＋ *trnH-psbA*	
	PCR	SEQ	PCR	SEQ	PCR	SEQ	Either PCR	Both SEQ	Either PCR	Both SEQ	Either PCR	Both SEQ	Either PCR	Both SEQ
NO. of species (50)*	35	35	38	38	33	33	38	35	38	33	38	33	38	33
Percent (％)	70	70	76	76	66	66	76	70	76	66	76	66	76	66
NO. of samples (121)	100	99	102	102	91	91	102	99	102	91	100	91	102	91
Percent (％)	82.64	81.82	84.30	84.30	75.21	75.21	84.30	81.82	84.30	75.21	82.64	75.21	84.30	75.21
Mean length	868#		463		771		——		——		——		——	

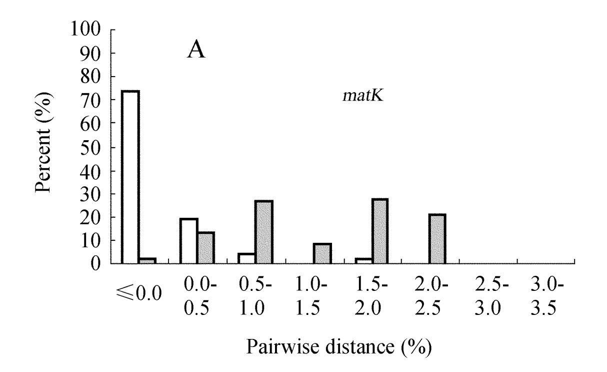
* 50 个种是已经确定的种个体数，材料中还有 28 个个体只确定到属。#868 bp 长度包括了 gap 的长度。

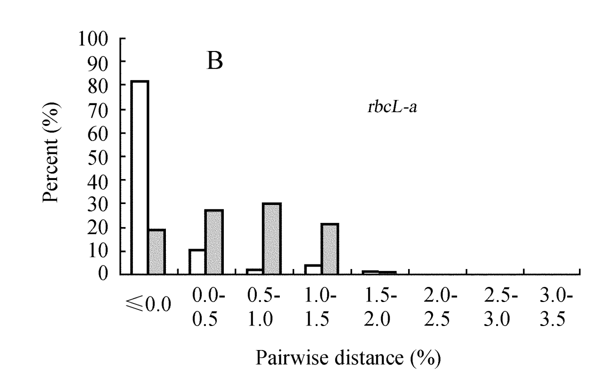
* 50 certain species，28 uncertain species. #868 bp include gaps

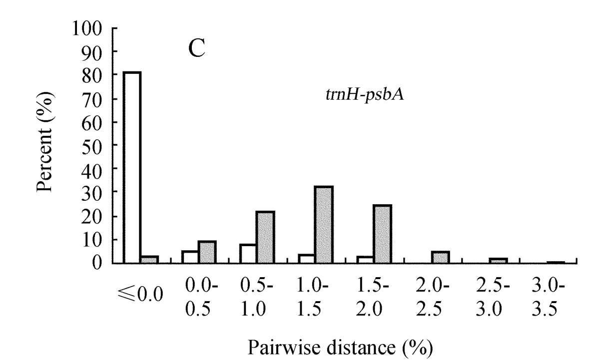
同时也受到种内不同居群个体间差异的影响，而两个或三个片段组合的PCR和SEQ的成功率主要受低成功率片段的影响。根据目前的研究，植物条码将很可能是一个多片段的组合，这就对每个候选片段的引物通用性要求更高，尤其是现在很看好的*matK*片段，迫切需要开发出高通用性的引物。

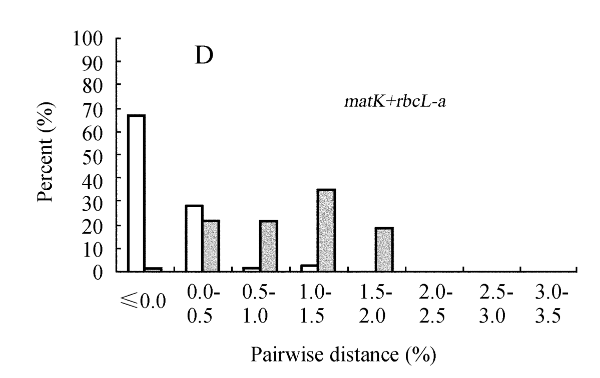
2.2　种间与种内的Barcoding gap

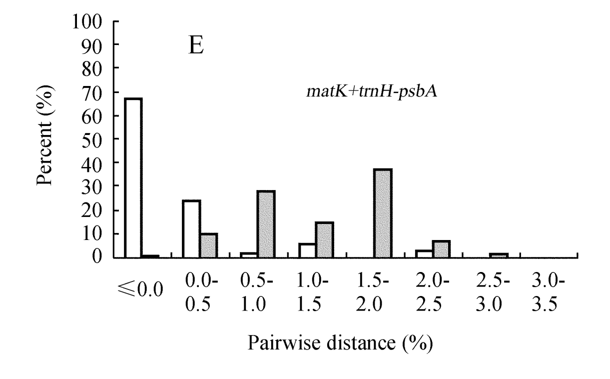
Barcoding gap通过计算得到种间、种内的K2P（Kimura 2-parameter）距离，然后用频率直方图表示（图1），采用中位数和Wilcoxon双样本检验的方法进行差异显著性检验（表2）。检验结果显示，种间与种内K2P距离有显著性差异，但单片段和片段组合的种间、种内距离都

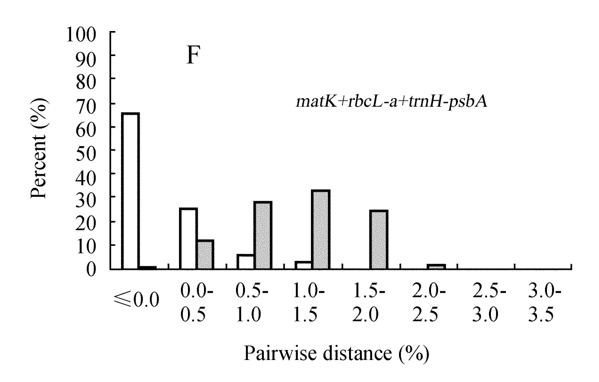












□ intra-specific　　　▨ inter-specific

图1　不同条形码种间和种内K2P距离的频率直方图

A：*matK*；B：*rbcL-a*；C：*trnH-psbA*；D：*matK*＋*rbcL-a*；E：*matK*＋*trnH-psbA*；

F：*matK*＋*rbcL-a*＋*trnH-psbA*。X轴表示K2P距离，Y轴表示是出现的累计频率

Fig.1　The frequency distribution of inter- and intra-specific Kimura 2-parameter (K2P) distances for six candidate loci

A：*matK*；B：*rbcL-a*；C：*trnH-psbA*；D：*matK* ＋ *rbcL-a*；E：*matK* ＋ *trnH-psbA*；F：*matK* ＋ *rbcL-a*＋*trnH-psbA*.

The X axis relates to the K2P distances, and the Y axis corresponds to the number of occurrences

表2　不同片段及不同片段组合的种间种内距离的差异显著性检验

Table 2　Significance tests of divergence on inter-versus intra-specific distances of each locus and different loci combination

Region	Median test	Wilcoxon two-sample test
matK	＃A＝73 ＃B＝73，Median＝1.07，p＜＝1.13e-31	＃A＝73 ＃B＝73，W＝2772，p＜＝3.426e-24
rbcL-a	＃A＝67 ＃B＝67，Median＝0.354，p＜＝8.74e-26	＃A＝67 ＃B＝67，W＝2435，p＜＝1.614e-20
trnH-psbA	＃A＝63 ＃B＝63，Median＝0.858，p＜＝7.74e-25	＃A＝63 ＃B＝63，W＝2097，p＜＝1.641e-20
matK ＋ *rbcL-a*	＃A＝58 ＃B＝58，Median＝0.831，p＜＝4.03e-25	＃A＝58 ＃B＝58，W＝1769，p＜＝3.165e-19
matK ＋ *trnH-psbA*	＃A＝58 ＃B＝58，Median＝1.09，p＜＝2.78e-24	＃A＝58 ＃B＝58，W＝1766，p＜＝2.723e-19
matK ＋ *rbcL-a* ＋ *trnH-psbA*	＃A＝58 ＃B＝58，Median＝0.919，p＜＝1.79e-23	＃A＝58 ＃B＝58，W＝1769，p＜＝3.165e-19

没有表现出显著的 gap（即明显的间隔区），如图 1 所示，各个条码的种间、种内距离都有很多重叠区，且有很多种间距离为 0，在单片段条码中表现更明显尤其是 *rbcL-a* 。虽然没有显著的 barcoding gap，但单片段中 *matK* 以及联合片段中 *matK*＋*rbcL-a*＋*trnH-psbA* 的种间、种内距离的重叠区仍是最小的，这说明单片段条码中 *matK* 表现最好，联合片段条码中 *matK*＋*rbcL-a*＋*trn*H-*psb*A 表现最好。

2.3　不同片段和联合片段的正确鉴定率（CI）

单片段的正确鉴定率以 *matK* 为最高，且明显高于 *trnH-psbA* 和 *rbcL-a* 。当正确鉴定率乘上 PCR 的成功率后，三个片段的正确鉴定率均降低，但仍是 *matK* 表现最好。与单片段的正确鉴定率相比，联合片段的正确鉴定率较高，尤其三片段联合时即 *matK*＋*trnH-psbA*＋*rbcL-a* 的正确鉴定率最高（59.65％）（表 3）。

当参考 Hollingsworth 等（2009）的“同种个体分组聚类”标准时，分辨力最好的是 *matK* 、*rbcL-a* 和 *trnH-psbA* 联合矩阵的 NJ 树（图 2）。从图中可以看出，很多种聚在了同一个分支上，如 *A. yunnanense* ，这种情况下就很清楚的鉴定到种，但是也有几个种聚在一个枝上，如 *A. microcarpum* 和 *A. neoaurantiacum* ，这种情况下如果单纯的依据条形码就很难鉴定到种。这种方法的结果和 BLASTn 的结果基本相同，三片段组合条码的正确鉴定率是最高的。

由此我们可以看出，无论采用哪一种计算方法，本研究中 *matK*、*rbcL-a* 和 *trnH-psbA* 三片段的联合条码的正确鉴定率均为最高，但由于联合片段条码较单片段条码受 PCR 扩增成功率和测序成功率的影响更大，所以高效通用引物的开发将是下一步工作的重点。

3　讨论

自 DNA Barcoding 提出以来，无论开始提出的单片段，还是现在提出的联合片段，都存在着很多的争论，至今仍然没有找到适合植物的条形码片段或组合。以往的研究多对所筛选片段的正确鉴定率和引物通用性进行了检验比较，本研究也是从这两个方面对所选的实验片段进行评价，以往研究多基于高阶分类单元（目、科水平），而本研究则侧重于同一属不同种的比较。

本研究中三个片段的 PCR 和 SEQ（Sequencing）的成功率均表现为保守的编码基因 *rbcL-a* 最高，非编码基因 *trnH-psbA* 次之（含有多个 Poly A 结构），而进化较快的 *matK* 最低（表 1），这与以往的研究结果是一致的（Kress and Erickson，2007；Fazekas 等，2008；Kress 等，2009）。在我们的实验结果中，三个片段的 PCR 的成功率均较低，这可能是因为本研究所用的实验材料由多方提供，有硅胶材料也有 DNA 原液，由于保存已久或保存不当等原因，影响了 PCR 的成功扩增率。由此可以看到，PCR 的成功

表3　不同片段及不同片段组合的正确鉴定率

Table 3　Frequency of correct identification（CI）％ of each locus and loci combination

Measure	Frequency of correct identification（％）					
	matK	*trnH-psbA*	*rbcL-a*	*matK*＋*rbcL-a*	*matK*＋*trnH-psbA*	*matK*＋*trnH-psbA*＋*rbcL-a*
CI only（％）	75.34	52.38	27.54	75.86	75.86	79.31
Recovery * CI（％）	56.67	42.86	23.21	57.06	57.06	59.65

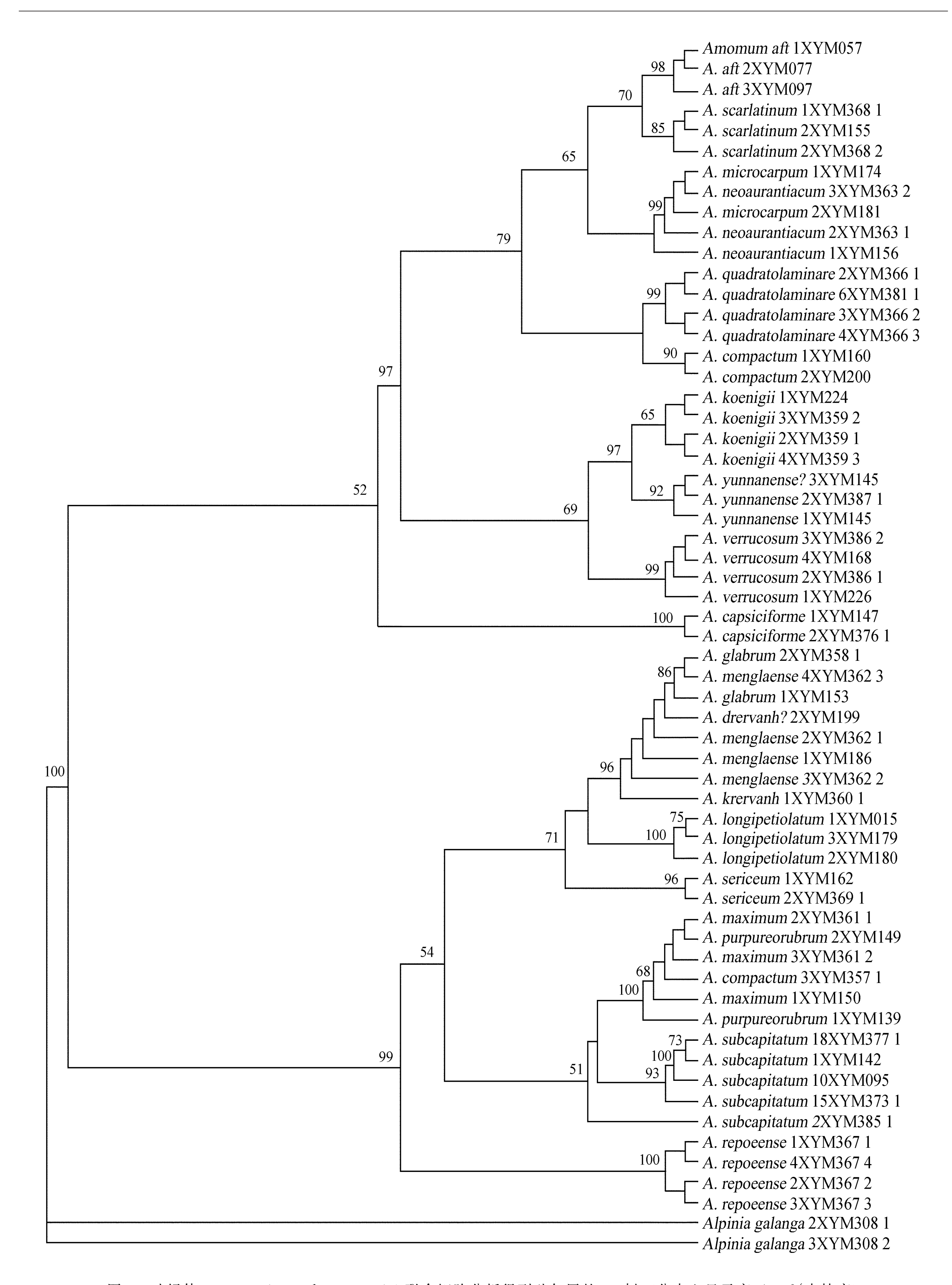


图2 叶绿体 *matK*、*rbcL-a* 和 *trnH-psbA* 联合矩阵分析得到砂仁属的 NJ 树（分支上显示高于50%支持率）

Fig. 2 The neighbor-joining tree based on the combined database of cpDNA data (*matK*, *rbcL-a* and *trnH-psbA*) for *Amomum*. Bootstrap values over 50% were shown above the branches

率除了受到通用引物和不同居群个体间差异的影响外，还受到 DNA 质量的影响。

在我们所评价的三个单片段中，*matK* 是表现最好的单片段条码（表 3），这与 Kress 等（2009）和 Hollingsworth 等（2009）的研究结果相同。CBOL Plant Working Group 在 2009 年也已经把 *matK* 定为植物条形码的核心片段。虽然 *matK* 片段鉴定率很高，但由于其较低的 PCR 扩增率，影响到了最终的正确鉴定率，所以尽快开发出适合于 *matK* 的高通用性引物，才能将 *matK* 广泛应用于植物条码的各大项目中（Lahaye 等，2008；CBOL Plant Working Group，2009）。而 *rbcL-a* 的正确鉴定率很低，也同样说明了此片段多可运用在目、科水平的鉴定上（Hollingsworth 等，2009；Liu 等，2010）。

在联合片段中，*matK* + *rbcL-a* + *trnH-psbA* 三个片段联合的条码的正确鉴定率高于任何单片段和两片段联合的条码，这也与 Kress 等（2009）和 Hollingsworth 等（2009）的研究结果一致。与以往研究相比，此三片段联合作为条码的正确鉴定率在本研究中略低，可能是由于本实验是基于属下的不同种的鉴定，而且姜科植物本身也存在较多近期分化的物种，所以这种结果是可以理解的，况且 DNA 条形码能否适用于近缘和近期分化的种的鉴别也是植物条形码研究中最大的争议点和难点（宁淑萍等，2008）。综上所述，我们推荐 *matK* + *rbcL-a* + *trnH-psbA* 三个片段联合的条码作为砂仁属潜在的鉴定候选条码。

致谢　中国科学院西双版纳热带植物园的夏永梅老师提供实验材料，美国国家标本馆的 W. John Kress 博士提供实验材料和数据处理方面给予的宝贵建议，中国西南野生生物种质资源库分子生物学实验中心的杨俊波、李洪涛老师给予实验技术指导，其他工作人员在实验过程中给予的帮助。

〔参　考　文　献〕

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA *et al*., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Research*, **25** (17): 3389—3402

Burland TG, 2000. DNASTAR′S lasergene sequence analysis software [J]. *Methods in Molecular Biology*, **132**: 71—91

CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106** (31): 12794—12797

Chase MW, Salamin N, Wilkinson M *et al*., 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360** (1462): 1889—1895

Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM *et al*., 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, **56** (2): 295—299

Cowan RS, Chase MW, Kress WJ *et al*., 2006. 300 000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants [J]. *Taxon*, **55** (3): 611—616

Doyle J, Doyle J, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemistry*, **19**: 11—15

Erickson DL, Kress WJ, Spouge J *et al*., 2008. DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success [J]. *Taxon*, **57** (4): 1304—1316

Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR *et al*., 2008. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. *PLoS One*, **3** (7): e2802

Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM *et al*., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103** (4): 968—971

Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [M]. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95—98

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL *et al*., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270** (1512): 313—321

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR *et al*., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **270** (Suppl1): S96—S99

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS *et al*., 2004. Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLoS Biology*, **2** (10): 1657—1663

Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL *et al*., 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9** (2): 439—457

Kress WJ, Erickson DL, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, **2** (6): e508

Kress WJ, Erickson DL, Jones FA *et al.*, 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106** (44): 18621—18626

Kress WJ, Prince LM, Williams KJ *et al.*, 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): Evidence from molecular data [J]. *American Journal of Botany*, **89** (10): 1682—1696

Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA *et al.*, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102** (23): 8369—8374

Lahaye R, Van der Bank M, Bogarin D *et al.*, 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** (8): 2923—2928

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP *et al.*, 2007. Clustal W and clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, **23** (21): 2947—2948

Liu Y, Yan HF, Ge XJ *et al.*, 2010. Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses) [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, **48** (1): 36—46

Meier RS, Kwong S, Vaidya G *et al.*, 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low indentification success [J]. *Systematic Biology*, **55**: 715—728

Meyer CP, Paulay G, 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. *PLoS Biology*, **3** (12): 2229—2238

Ning SP (宁淑萍), Ge XJ (葛学军), Yan HF (颜海飞) *et al.*, 2008. Current advances of DNA barcoding study in plants [J]. *Biodiversity Science* (生物多样性), **16** (5): 417—425

Pennisi E, 2007. Taxonomy-Wanted: A barcode for plants [J]. *Science*, **318**: 190—191

Sakai S, Nagamasu H, 1998. Systematic studies of Bornean Zingiberaceae I. *Amomum* in Lambir Hills, Sarawak [J]. *Edinburgh Journal of Botany*, **55** (1): 45—64

Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF, 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae) [J]. *American Journal of Botany*, **84** (8): 1120—1136

Smith RM, 1985. A review of Bornean Zingiberaceae: I. (Alpineae p. p.) [J]. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh*, **42**: 261—314

Swofford DL, 2002. PAUP* 4.0b10: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), beta version [CP]. Sunderland: Sinauer Associates, Inc

Tautz D, Arctander P, Minelli A *et al.*, 2002. DNA points the way ahead in taxonomy [J]. *Nature*, **418**: 479

Tautz D, Arctander P, Minelli A *et al.*, 2003. A plea for DNA taxonomy [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, **18** (2): 70—74

Tang ZL (唐中林), Yang SL (杨述林), L K (李奎) *et al.*, 2009. International barcoding of life-DNA barcoding [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine* (中国畜牧兽医), **36** (8): 49—53

Tsai HT (蔡希陶), Chen PS (陈佩珊), Zhao SW (赵世望), 1981. *Amomum* in Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, **2** (16): 110—135

Wu TL, Larsen K, 2000. Zingiberaceae [A]. In: Wu ZY, Raven PH eds. Flora of China [M]. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, **24**: 322—377

Xia YM, Kress WJ, Prince LM, 2004. Phylogenetic analyses of *Amomum* (Alpinioideae: Zingiberaceae) using *ITS* and *matK* DNA sequence data [J]. *Systematic Botany*, **29** (2): 334—344

Yancy HF, Zemlak TS, Mason JA *et al.*, 2008. Potential use of DNA barcodes in regulatory science: Applications of the Regulatory Fish Encyclopedia [J]. *Journal of Food Protection*, **71** (1): 210—217

Yoo HS, Eah JY, Kim JS *et al.*, 2006. DNA barcoding Korean birds [J]. *Molecules and Cells*, **22** (3): 323—327